

[Close](#)

Patent	JP02207089A2 View Image
Patent Evaluation	B+ (Score 5) Detail
Issued	August 16, 1990
Title	BACTERIAL TOXIN-NEUTRALIZING AGENT
Applicant	SNOW BRAND MILK PROD.CO.,LTD
Abstract	<p>Purpose: To provide a neutralizing agent for neutralizing bacterial exotoxin produced by <i>Vibrio cholerae</i>, poisonous <i>Escherichia coli</i>, <i>Salmonella</i>, etc., at a low cost by containing a specific sialic acid-bonded peptide or sialic acid- containing oligo saccharide as an active ingredient.</p> <p>Constitution: The objective neutralizing agent contains as an active ingredient either of a sialic acid-bonded peptide (preferably k-casein glycomacropeptide) prepared by treating milk-originated sialic acid-bonded protein (preferably lactoferrin or k-casein), a sialic acid-bonded peptide (preferably k-casein glycomacropeptide) prepared by treating the sialic acid-bonded protein with a protease or a sialic acid-containing oligosaccharide.</p>
Inventor	ISODA HIROKO KAWASAKI NORIHIRO TANIMOTO MORIMASA DOSEMARU SHUNICHI IDOTA TADASHI
Appl. No.	1989027823 (2/7/1989)
IPC	G07H-007/033; A61K-031/78; A61K-037/18; A61K-037/18; G07K-015/04; G07K-015/24.
Family	Show Known Family Members (9 patent(s))
Legal Status	Show Legal Status / Legal Status of Family Members

⑫ 公開特許公報(A) 平2-207089

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)8月16日

C 07 H 7/033

A 61 K 31/70

37/16

37/18

C 07 K 15/04

15/24

ADQ

ADZ

7822-4C

7431-4C

8615-4C

8615-4C

8318-4H

8318-4H

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全8頁)

⑮ 発明の名称 細菌毒素中和剤

⑯ 特 願 平1-27823

⑰ 出 願 平1(1989)2月7日

⑱ 発 明 者 渡 田 博 子 埼玉県所沢市荒幡945-8

⑲ 発 明 者 川 崎 功 博 埼玉県川越市新宿町5-11-3

⑳ 発 明 者 谷 本 守 正 埼玉県狭山市水野470-7

㉑ 発 明 者 堂 迫 俊 一 埼玉県浦和市北浦和5丁目15番39-616号

㉒ 発 明 者 井 戸 田 正 埼玉県川越市大字古谷上6083番地 川越グリーンパークL1
-207

㉓ 出 願 人 雷 印 乳 業 株 式 有 限 公 司 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

㉔ 代 理 人 弁 理 士 宮 田 広 豊

明 細 書

中和剤に関する。

1. 発明の名称

従来の技術

細菌毒素中和剤

コレラ菌による食中毒は、腹痛に伴う激しい下痢をひきおこす。このため、コレラ菌感染者は、

2. 特許請求の範囲

下痢により極端な脱水症状を呈し、極端な例ではこのため死亡する場合もある。コレラ菌による食中毒の場合に見られる激しい下痢は、コレラ菌が菌体外に生産するコレラトキシンと呼ばれるエンテロトキシンによるものであることが明らかになっている。コレラトキシンは、分子量84,000の蛋白質でAサブユニット1個とBサブユニット5個からなり、この内Bサブユニットが小腸粘膜細胞に存在するレセプターに結合し、A成分が細胞内に侵入し、細胞内のサイクリックAMP量を増大せしめ、膜透過性が変化し、細胞内水分及び塩類が細胞外に流出し、下痢をひきおこすとされている。このような毒素は毒性大腸菌や、サルモネラ菌からも分離されており、食中毒原因のかなりの部分を占めると推定されている。

- (1) 牛乳由来のシアル酸結合蛋白質もしくはシアル酸結合蛋白質をプロテアーゼ処理して得られるシアル酸結合ペプチド又はシアル酸含有オリゴ糖のいずれかを有効成分として含有することを特徴とする細菌性エンテロトキシン中和剤。
- (2) シアル酸結合蛋白質がラクトフェリンもしくはα-カゼインであり、シアル酸結合ペプチドがα-カゼイングリコマクロペプチドであり、シアル酸結合オリゴ糖がシアリラクトースである請求項1に記載の細菌性エンテロトキシン中和剤。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、コレラ菌、毒性大腸菌、サルモネラ菌等により生産される細菌性エンテロトキシンの

小腸粘膜細胞に存在するレセプターは糖脂質であることが確認されており、コレラトキシンのレセプターとして G_{M1} などのガンリオシッドが同定されている。すでにこの G_{M1} をコレラ毒素の中和剤として利用する試みがなされている。例えば、特表昭56-500138号公報には、コレラトキシンの中和作用を有する G_{M1} などのガンリオシッドをラテックス等に固定化し、中和剤として使用する技術が開示されている。又特開昭60-72819号公報には牛乳中の脂肪球皮膜を熱処理し脂肪球皮膜に含まれる G_{O3} 、 G_{M3} 、 G_{M5} を抽出することなく、毒素中和剤として使用する技術が開示されている。

しかし、現在のところ G_{M1} は牛などの脂に微量含まれているだけであり、大量にかつ安価に供給することが困難であつた。又、牛乳等の乳中脂肪球皮膜を利用する方法についても、得られる脂肪球皮膜中の有効成分であるガンリオシッドの濃度が一定でなく、かつ壊滅も安定しないなどの欠点を有している。

ゼインは通常は牛乳中にカゼインミセルの状態が存在しており、牛乳中の全蛋白質当り約11%含有され、カゼイン成分より等電点沈降法等公知の方法により得ることができ、又、特開昭59-918号公報開示の限外濾過による方法も採用し得る。

ラクトフェリンは牛乳中の乳清成分に含まれる鉄結合性蛋白質であり、公知のゲル濾過等の方法により得ることが可能である。また、特開昭61-14520号公報に開示された抗ラクトフェリン抗体を用いた方法も採用し得る。

このようにして得られた κ -カゼイン、ラクトフェリン等のシアル酸結合糖蛋白質を細菌性エンテロトキシン中和剤として使用し得る。このシアル酸結合蛋白質をプロテアーゼ処理したシアル酸結合ペプチドも同様に使用できる。特に κ -カゼインをレンネットで処理して得られる κ -カゼイングリコクロペプチド（以下GMPと略称する）は、レンネットカゼインホエーから回収される。又、GMP以外のシアル酸結合ペプチドは、牛乳

発明が解決しようとする課題

本発明は、コレラトキシンの等エンテロトキシンの研究を鋭意進めた結果なされたものであつて、コレラ菌、毒性大腸菌、サルモネラ菌の生産する細菌毒素に対して中和活性を有し、かつ安全で、しかも安価に大量供給可能な細菌性エンテロトキシン中和剤を提供することを課題とする。

なお、ここでいうエンテロトキシンは、コレラトキシンの、毒性大腸菌由来のエンテロトキシンを含むものである。

課題を解決するための手段

本発明の特徴は、細菌性エンテロトキシン中和剤として、牛乳由来のシアル酸結合蛋白質もしくはシアル酸結合蛋白質をプロテアーゼ処理して得られるシアル酸結合ペプチド又はシアル酸含有オリゴ糖のいずれかを用いることにある。

本発明に用いる牛乳由来のシアル酸結合蛋白質は牛乳中に存在している糖蛋白質であり、 κ -カゼイン、ラクトフェリン等が例示できる。 κ -カ

ゼインより得られたシアル酸結合蛋白質にプロテアーゼを作用させ、その後ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等の分離手段を単独もしくは組合わせることにより得ることができる。

尚、上記プロテアーゼとしては、エンドペプチターゼに属するものであれば良く、ペプシン、トリプシン、パバイン、キモトリプシン、プロナーゼ、レンネット、パンクレアチン、フィシン等を例示できる。シアル酸結合ペプチドを得る方法としては、特開昭63-284133号公報に開示されている方法を、又、GMPを得る方法としては、特開昭63-284199号公報に開示されている方法を採用し得る。

本発明に用いられるシアル酸結合オリゴ糖としては、糖鎖の末端にシアル酸を有するオリゴ糖であればどのようなものであつても使用可能である。又合成された化合物或いは天然物から抽出された物でも使用可能である。例えば、特開昭59-181497

号公報に開示された方法により得られるシアリルラクトースや、特開昭61-12695号公報に開示されたシアリル酸誘導体、さらには G_{23} 、 G_{21} 、 G_{22} 等のガングリオシッド特有の糖鎖もこの目的に使用し得る。

これらのシアリル酸含有オリゴ糖の内上述のシアリルラクトースが牛乳中に大量に含まれており、本発明の目的から特に好ましい。

上述したシアリル酸結合蛋白質、シアリル酸結合ペプチド、シアリル酸結合オリゴ糖は、単独あるいは混合して使用することができる。エンテロトキシン中和剤としての製剤化に任意である。標準的な服用量は毒素の種類によっても異なるが、 $5\mu\text{g}\sim 300\mu\text{g}$ を成人1日当りの服用量とすることができる。又、必要に応じて、食品中へ混合することや、家畜等の動物に対して発病予防として飼料中に混合して投与することも可能である。

本発明に係るシアリル酸結合蛋白質、シアリル酸結合ペプチドは牛乳由来の蛋白質およびこの蛋白質

を酵素加水分解したものであり、安全性上何ら問題がない。又、乳蛋白質として供給量は充分確保可能である。特にGMPは従来チーズ製造時の副産物として廃棄されていたチーズホエーから回収可能なためさらに安価に供給できるものである。

シアリル酸含有オリゴ糖も広く自然界に分布しており、その安全性は確認されている。シアリルラクトースについては特開昭59-184197号公報に開示された方法に従って得ればチーズホエーから安価に回収される。

次に本発明のエンテロトキシン中和活性を具体的な試験例について説明する。

試験例I

コレラトキシン、毒性大腸菌エンテロトキシンによるチャイニーズハムスター卵巣細胞形態変化に対する阻止効果試験

①チャイニーズハムスター卵巣細胞形態変化阻害性 測定に用いるコレラトキシン、エンテロトキシン 濃度の決定

抗原性の異なる2種のエンテロトキシンであるCPA/Ⅰ(LT-Ⅰ)とエンテロトキシンCPA/Ⅱ(LT-Ⅱ)を産生する2種の毒性大腸菌(都立衛生研究所より分与された血清型H-1040:F株、Ph-176株)を普通CAV22培地にて振盪培養した。この培養液を遠心分離し、得られた上清を1/10～1/1000まで段階的に希釈し、それぞれの希釈液を氷上に置いたLab-Tek 8チャンパー(フローラボラトリーズ製)に入れた。またコレラトキシンCT(リストバイオロジカルラボラトリーズ製)についても同様に希釈し、Lab-Tek 8チャンパー(以下8チャンパーと記す)に入れた。次いで8チャンパーの各穴に1%牛胎児血清を含むダルベッコ培地(FCS/DMEM)を400 μL 入れ、これに10%FCS/DMEM中で培養したチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-K1細胞(ATCC CCL6))を5000cells/mlになるように10%FCS/DMEM中に懸濁させた細胞懸濁液を50 μL 入れ、5%CO₂濃度のイン

キュベータ中で37度で1夜培養した。その後培地を捨て、リン酸緩衝生理食塩水(PBS(-))でチャンパー内を洗浄し、さらにチャンパー内の細胞をメタノールに10分浸漬し、固定し、ギムザ染色液で細胞を染色し、風乾した。

顕微鏡により、一つの試料について200～400個の細胞を観察し、変形した細胞数の割合を数え、各毒素の各濃度当りのCHO-K1細胞の形態変化率を算出した。

CTでは10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、LT-Ⅰ、LT-Ⅱでは培養上清そのものでCHO-K1細胞を少くとも70%以上形態変化させ得ることが判明した。以下の実験例では、この濃度の各毒素を用いることとした。

②CHO-K1細胞形態変化阻止活性

シアリル酸結合蛋白質としてエーカゼイン、ラクトフェリン(LF)、シアリル酸結合ペプチドとしてGMP、シアリル酸含有オリゴ糖としてシアリルラクトース(SL)のエンテロトキシンに対する細胞形態変化に対する阻止活性を確認した。又、併

せてガングリオシッド G_{a3} についても確認を行った。

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の CT および LT-1、LT-2 に培養上清をそれぞれ10 μl ずつ氷上に置いた3チャンパーに入れ、これに各サンプルを必要濃度に PBS (-) に溶解した液を50 μl 加え振盪し反応させた。その後各チャンパーに1% FCS/DME M を400 μl 、C12H1細胞懸濁液を50 μl 入れ培養し、5% CO₂ インキュベーター中で1夜培養した。その後メタノール固定、ギムザ染色を行い、形態変化率を測定した。CT、LT-1、LT-2 各毒素に対し、1 $\mu\text{g}/\text{穴}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{穴}$ の各サンプルを追加した場合の形態変化率を図1、2、3に示す。

κ -カゼイン、Lf、GMP、SL とも C12H10細胞に対するCT、LT-1、LT-2の毒性を中和していることが確認された。

③ CT とガングリオシッド G_{a3} の結合に対する阻害効果

ン酸-2アンモニウム塩 (ABTS) を0.3 mg/ml 濃度に溶解した0.006 M H_2O_2 を含む0.2 M クエン酸緩衝液 (pH 4.0) を100 μl 加え、10分後に405 nm で吸光度を測定することで G_{a3} と、コレラトキシンBサブユニットの結合率を評価した。

図4～図6に示す通り各サンプルとも濃度に依ってコレラトキシンBサブユニットと G_{a3} の結合を阻害した。

以上の試験結果から、 κ -カゼイン、Lf、GMP、SL は細菌性エンテロトキシンの毒性を中和し、細胞レセプターへの結合を阻害することが確認された。

以下に実施例を示し、さらに本発明を具体的に説明する。

実施例1

コレラトキシンの毒性の中和効果

体重約200 g の 8 $\alpha\text{1b/c}$ 系コトマウス80匹を5匹ずつ16群にわけ、内1群をコントロールとし、さらに15群を5分し、それぞれに κ -カゼイン、Lf、

CT は上述したようにBサブユニットが細胞表面のガングリオシッド G_{a3} レセプターを介し結合し、細胞内にAサブユニットが侵入し、毒性を発現する。 G_{a3} とコレラトキシンBサブユニットの結合阻害性を試験した。

96穴平底プラスチックプレートに G_{a3} のエタノール溶液 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を50 μl 入れ、エタノールを蒸発乾燥し、 G_{a3} をプレートに吸着させた。これに1%牛血清アルブミンのPBS溶液 (BSA/PBS) を満たし1時間放置後、0.05% Tween 20を含むPBS (PBS Tween 20) で3回洗浄した。一方、各サンプルは1% BSA/PBS 溶液として各25 μl をペルオキシゲナーゼラコレラトキシンBサブユニット (PO-CTB) の1% BSA/PBS 溶液 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 25 μl と予め混合し、30分間室温でインキュベートする。この混合液を上記した G_{a3} 吸着プレートに加え、30分放置後、PBS Tween 20 で6回洗浄し、2,2'-アジノビス (3-エチルベンズチアゾリンスルホ

GMP、SL、 G_{a3} を投与した。各サンプルとも0.2、0.5、1.0 $\text{mg}/\text{日}/\text{匹}$ の投与量で7日間経口強制投与した。8日目に水、又は各サンプルとCT 0.25 mg の混合液を経口投与し、その後、マウスの下痢発生率を観察した。

表1に示す通り、各サンプル投与群ともコントロールと比較して大巾な下痢発生率の減少を示した。

表 1

in vivoにおけるコレラトキシンの毒素中和活性

試料	投与量(mg/日)	下痢発生率(%)
対 照	—	100
κ-カゼイン	0.2	60
	0.5	20
	1.0	20
CMP	0.2	60
	0.5	20
	1.0	0
Lf	0.2	60
	0.5	40
	1.0	20
SL	0.2	20
	0.5	20
	1.0	0
G ₉₃	0.2	20
	0.5	20
	1.0	0

表 2

in vivoにおけるエンテロトキシンLT-Iの毒素中和活性

試料	投与量(mg/日)	下痢発生率(%)
対 照	—	100
κ-カゼイン	0.2	80
	0.5	40
	1.0	20
CMP	0.2	60
	0.5	20
	1.0	20
Lf	0.2	40
	0.5	20
	1.0	0
SL	0.2	40
	0.5	40
	1.0	20
G ₉₃	0.2	60
	0.5	20
	1.0	20

実施例2

毒性大腸菌由来エンテロトキシンLT-Iの毒性中和効果

実施例1に示す方法と同様の試験方法により各サンプルのLT-I毒性の中和効果を確認した。尚、LT-Iは試験例①に示した培養上清100μlを投与した。

表2に示すとおり、各サンプル投与群ともコントロールと比較して大巾な下痢発生率の減少を示した。

実施例3

毒性大腸菌由来エンテロトキシンLT-IIの毒性中和効果

実施例1に示す方法と同様の試験方法により各サンプルのLT-II毒性の中和効果を確認した。尚、LT-IIは試験例①の培養上清100μlを投与した。

表3に示す通り、各サンプル投与群ともコントロールと比較して大巾な下痢発生率の減少を示した。

表 3

in vivoにおけるエンテロトキシン(ET-B)の毒素中和活性

試料	投与量(mg/日)	下痢発生率(%)
対照	—	100
κ-カゼイン	0.2	60
	0.5	60
	1.0	20
GMP	0.2	40
	0.5	20
	1.0	0
Lf	0.2	60
	0.5	20
	1.0	20
SL	0.2	40
	0.5	20
	1.0	0
Gsa	0.2	40
	0.5	40
	1.0	20

リオシッドG_{sa}との結合に対する阻害効果を示したものである。

発明の効果

以上述べたごとく、本発明に係る中和剤の有効な成分であるシアル酸結合蛋白質、シアル酸結合ペプチド、シアル酸含有オリゴ糖は、いずれもコレラトキシンをはじめとする細菌性エンテロトキシンがレセプターに結合することを阻害し、毒性を中和する効果を示すことから、本発明は上記細菌性エンテロトキシンの中和剤として有効に利用できる。また、本発明の中和剤の上記各成分はその安全性も確認されており、さらに、牛乳等の処理による廃棄物から、安価にかつ大量に入手し得るのでコストの面からも実用性が高い。

本発明の実施により毒性のない、コレラトキシン等細菌性エンテロトキシンの中和剤が、安定にかつ安価に供給が可能となる。

4. 図面の簡単な説明

図1～3は、本発明に係る中和剤の各有効成分の各毒素に対する形態変化率を示したものであり、図4～8は本発明の中和剤による、CTとガンダ

出願人 雪印乳業株式会社
代理人 富田 広 豊

図 1

コレラトキシン誘発性の CHO K1 細胞形態変化に対する阻害効果

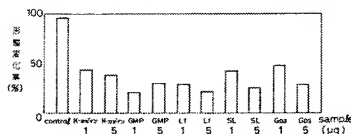


図 2

毒性大腸菌産 LT-II 誘発性の CHO K1 細胞形態変化に対する阻害効果

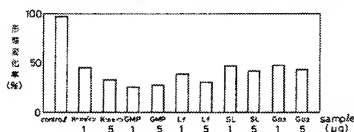


図 3

毒性大腸菌産 LT-II 誘発性の CHO K1 細胞形態変化に対する阻害効果

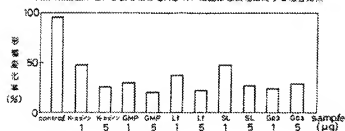


図 4

ワサビペルオキシダーゼ-コレラトキシンBサブユニットと
ガングリオシド G_{M1} の結合に対するK-カゼインの阻害効果

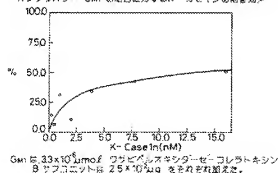


図 5

ワサビペルオキシダーゼ-コレラトキシンBサブユニットと
ガングリオシド G_{M1} の結合に対するラウリルエタノール (LE) の阻害効果

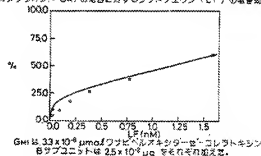


図 6

ワサビペルオキシダーゼ-コレラトキシンBサブユニットと
ガングリオシド G_{M1} の結合に対するK-カゼイングリコシルホスファテド (GMP) の阻害効果

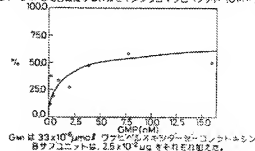
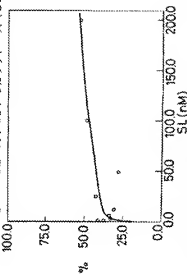


図 7

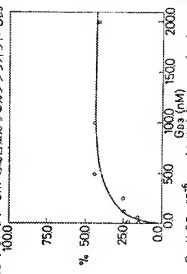
ワザビオールオキシダーゼ-コレラトキシシンBサブユニットと
ガングリザシド Gm1 の割合に依るシアルリクトース (SL) の阻害効果



Gm1は、 3.3×10^{-6} μmol ワザビオールオキシダーゼ-コレラトキシシン
Bサブユニットは、 2.5×10^{-6} μg をそれぞれ用いた。

図 8

ワザビオールオキシダーゼ-コレラトキシシンBサブユニットと
ガングリザシド Gm1 の割合に対するカンダリクト G63 の阻害効果



Gm1は、 3.3×10^{-6} μmol ワザビオールオキシダーゼ-コレラトキシシン
Bサブユニットは、 2.5×10^{-6} μg をそれぞれ用いた。

手続補正書

平成1年11月20日



特許庁長官 吉田 文 毅 様

1. 事件の要示 平成1年特許第27623号

2. 発明の名称 細菌毒素中和剤

3. 補正をする者
事件との関係 特許出願人

名 称 (669) 雪印乳業株式会社

4. 代理人

住 所 東京都千代田区錦町5丁目4番
クロスサイト麹町ビル7階
郵便番号102 電話 288-2791~2792
氏 名 (7027) 弁護士 宮 田 広 宣

5. 補正命令の日付 自 発

6. 補正により増加する発明の数

7. 補正の対象 明細書

8. 補正の内容 明細書第17頁の表2を別紙のとおり
補正する。方式
審査 関

表 2

in vivoにおけるエンテロトキシシンLT-1の毒素中和活性

試 料	投与量(mg/日)	下痢発生率(%)
対 照	—	100
	0.2	80
	0.5	40
キ-カゼイン	1.0	20
	0.2	60
	0.5	20
GMP	1.0	20
	0.2	40
	0.5	20
LT	1.0	20
	0.2	40
	0.5	20
SL	1.0	20
	0.2	40
	0.5	20
Gss	1.0	20
	0.2	60
	0.5	20